



REC'D 24 MAR 2003
WIPO
PCT

109 JUL 2004

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 JAN. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W /300301

REMISE DES PIÈCES DATE 10-01-02 LIEU 75 B N° D'ENREGISTREMENT 0200268 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 10 JAN. 2002		Réervé à l'INPI	
1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE			
Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE			
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> 239490 PM			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
22 NATURE DE LA DEMANDE			
Cochez l'une des 4 cases suivantes			
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>	
23 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCEDE DE CLONAGE NUCLEAIRE CHEZ LE LAPIN ET UTILISATIONS.			
24 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation <input type="text"/> Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> Date <input type="text"/> N° <input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »			
25 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTÈRE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE	
N° SIREN		180070039	
Code APE-NAF			
Adresse		Rue 145, rue de l'Université 75007 PARIS	
		Code postal et ville <input type="text"/>	
		Pays FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2**

REMISE DES PIÈCES	Réervé à l'INPI
DATE	10-01-02
LIEU	75 B
N° D'ENREGISTREMENT	09 00 268
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 3

Vos références pour ce dossier : (facultatif)		239490 PM																											
6 MANDATAIRE <table border="1"> <tr> <td>Nom</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Prénom</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Cabinet ou Société</td> <td colspan="2">Cabinet REGIMBEAU</td> </tr> <tr> <td>N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>20, rue de Chazelles</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td colspan="2">75847 PARIS CEDEX 17</td> </tr> <tr> <td>N ° de téléphone (facultatif)</td> <td colspan="2">01 44 29 35 00</td> </tr> <tr> <td>N ° de télécopie (facultatif)</td> <td colspan="2">01 44 29 35 99</td> </tr> <tr> <td>Adresse électronique (facultatif)</td> <td colspan="2">info@regimbeau.fr</td> </tr> </table>			Nom			Prénom			Cabinet ou Société	Cabinet REGIMBEAU		N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			Adresse	Rue	20, rue de Chazelles	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17		N ° de téléphone (facultatif)	01 44 29 35 00		N ° de télécopie (facultatif)	01 44 29 35 99		Adresse électronique (facultatif)	info@regimbeau.fr	
Nom																													
Prénom																													
Cabinet ou Société	Cabinet REGIMBEAU																												
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel																													
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles																											
Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17																												
N ° de téléphone (facultatif)	01 44 29 35 00																												
N ° de télécopie (facultatif)	01 44 29 35 99																												
Adresse électronique (facultatif)	info@regimbeau.fr																												
7 INVENTEUR (S) <table border="1"> <tr> <td>Les inventeurs sont les demandeurs</td> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</td> </tr> </table>			Les inventeurs sont les demandeurs	<input type="checkbox"/> Oui		<input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée																							
Les inventeurs sont les demandeurs	<input type="checkbox"/> Oui																												
	<input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée																												
8 RAPPORT DE RECHERCHE <table border="1"> <tr> <td>Établissement immédiat ou établissement différé</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Paiement échelonné de la redevance</td> <td colspan="2">Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Non</td> </tr> </table>			Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Paiement échelonné de la redevance	Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques			<input type="checkbox"/> Oui		<input type="checkbox"/> Non																
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/>																												
	<input type="checkbox"/>																												
Paiement échelonné de la redevance	Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques																												
	<input type="checkbox"/> Oui																												
	<input type="checkbox"/> Non																												
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <table border="1"> <tr> <td>Uniquement pour les personnes physiques</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</td> </tr> </table>			Uniquement pour les personnes physiques	<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)	<input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):																								
Uniquement pour les personnes physiques																													
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)																													
<input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):																													
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes																													

10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)  Q11253	VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 
---	--

La présente invention se rapporte à un procédé de clonage nucléaire de vertébrés, notamment de mammifères, et plus particulièrement de lapin. L'invention se rapporte également aux animaux ainsi 5 produits, notamment des lapins, au stade fœtal ou adulte, ainsi qu'à leur utilisation pour la production de molécules d'intérêt ou comme modèles animaux d'étude de pathologies humaines.

Le lapin est de plus en plus considéré dans 10 l'industrie biotechnologique pour les avantages qu'il procure par rapport aux autres espèces animales. Tout d'abord, d'un point de vue phylogénique, le lapin est plus proche des primates, c'est-à-dire de l'homme, que les rongeurs, souris et rats, couramment utilisés à 15 l'heure actuelle (Graur et al., 1996). Ensuite, le lapin est mieux adapté au manipulations physiologiques de par sa taille, contrairement aux animaux de petites tailles tels les rongeurs, souris et rat, ou les animaux de grande taille, tels les vaches, chèvres, 20 brebis, porcs etc... Enfin la taille importante des portées et une reproduction rapide sont autant d'atouts pour un animal de laboratoire destiné à l'étude de pathologies humaines ou à la production de protéines recombinantes d'intérêt. Ainsi par exemple, le modèle 25 lapin est d'un grand intérêt pour l'élaboration d'un traitement clinique de l'artériosclérose (Hoeg et al., 1996) et de la mucoviscidose (Chen et al., 2001).

Le transfert nucléaire somatique associé à des modifications génétiques des cellules donneuses de 30 noyaux pourrait rendre extrêmement intéressante l'utilisation du lapin comme animal de laboratoire (Fan et al., 1999) qui pour l'heure est confiné à la

production de protéines recombinantes d'intérêt en large quantité (Stinnackre et al., 1997). La technologie de transfert nucléaire est très intéressante car elle permet la production rapide d'un grand nombre d'animaux génétiquement identiques, ou de leurs descendants, ayant des caractéristiques génétiques particulières. Cependant, à ce jour, le transfert nucléaire chez le lapin n'a jamais pu être mis en œuvre avec succès (Yin et al., 2000 ; Dinnyés et al., 2001) malgré le rôle pionnier du lapin dans les expériences de mise au point de la technologie de clonage nucléaire (Bromhall et al., 1975).

Un seul laboratoire de recherche a pu obtenir des débuts de gestations d'embryons à partir de noyaux de cellules somatiques (Yin et al., 2000), mais de manière surprenante aucune de ces gestations n'a pu atteindre leur terme.

Le lapin, pourtant utilisé initialement comme modèle animal pour la mise au point des techniques de transfert nucléaire (Bromhall et al., 1975) apparaît donc comme une espèce pour laquelle les technologies de clonage nucléaire existantes, qui ont donné des succès avec d'autres espèces tels le mouton (Wilmut et al., 1997 ; WO 97 07669), la souris (Wakayama et al., 1998 ; WO 99 37143), les bovins (Wells et al., 1999), la chèvre (Baguisi et al., 1999 ; WO 00 25578), le porc (Polejaeva et al., 2000), ne sont pas adaptées. Il existe donc un grand besoin de développer un nouveau procédé de clonage nucléaire d'espèces animales qui jusqu'à présent ne peuvent être clonées avec efficacité par les méthodes de transfert nucléaire actuellement disponibles, et notamment de développer un procédé de

clonage nucléaire chez le lapin, qui soit à la fois efficace, reproductible et qui permettent d'obtenir de bon rendement de clonage.

C'est le problème que se propose de résoudre la 5 présente invention en fournissant un procédé de production d'embryons de mammifères comprenant les étapes suivantes :

10 (a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de même espèce et du même âge :

15 - le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé

in vitro ;

20 - le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique;

25 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon et ;

30 (b) transférer un embryon au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T (+/- 25\% T)$;

(c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

En principe, la présente invention est applicable à 5 tous les mammifères. Plus particulièrement, l'animal selon l'invention est un mammifère. L'invention est particulièrement intéressante pour les mammifères tels les ongulés, les équidés, les camélidés, les rongeurs, les lagomorphes et les primates. Parmi les rongeurs, il 10 convient de citer la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde. Parmi les ongulés, il convient de citer les bovins, les ovins, les caprins, les porcins. De manière préférée le mammifère selon l'invention est un lagomorphe. L'invention est particulièrement 15 intéressante pour les animaux qui jusqu'à présent étaient difficilement obtenus voire impossible à obtenir par clonage nucléaire, tel le lapin ou le rat.

Par « asynchronie », au sens de la présente invention, on entend désigner le temps ou retard 20 exprimé en heure qui existe à un instant donné du développement embryonnaire entre le stade de développement d'un embryon normalement fécondé et qui se développe selon les lois de la nature, et le stade de développement d'un embryon qui a un moment donné de 25 son développement à au moins été manipulé *in vitro*, les deux embryons étant de même age et de même espèce. Par embryons de même age, on entend définir que les embryons ont été conçus simultanément ou en même temps. Ainsi dans le cas d'un embryon normalement fécondé et 30 d'un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire, l'ovocyte énucléé aura le même age que l'ovocyte normalement fécondé par un spermatozoïde. Les

deux embryons peuvent appartenir à la même espèce animale mais aussi à des espèces différentes. Dans le cas du clonage nucléaire chez le lapin, les deux embryons sont des embryons de lapin. Ces deux embryons 5 peuvent être ou non de races différentes comme la race « New-Zealand », « Fauve-de-Bourgogne », « Argenté-de-Champagne », Californiennes, « Géant-dé-Bouscat », ou toutes races dont les spécificités zoologiques sont définies dans un standard officiel (Le lapin de race, 10 Ed. 2000 Fédération Française de Cuniculture (Ed.) ou issus de croisements ayant donné lieu à des souches commercialisées de lapins telle la souche GD22/1077.

Par « cultivé *in vitro* », on entend désigner au sens de la présente invention, un embryon qui n'est pas 15 naturellement conçu et/ou développé, c'est-à-dire un embryon pour lequel au moins une étape de sa conception et/ou de son développement est réalisée *in vitro*. Par exemple, l'embryon « cultivé *in vitro* » au sens de la présente invention est cultivé et se développe dans une 20 milieu de culture approprié contenant les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et/ou à la différenciation de l'embryon.

Par « manipulé *in vitro* », on entend désigner au sens de la présente invention, un embryon cultivé *in 25 vitro* obtenu par transfert nucléaire et/ou modifié génétiquement par trangenèse. L'embryon est cultivé et/ou manipulé *in vitro* au plus tard jusqu'au jour qui précède l'implantation.

Selon la présente invention, l'évaluation et/ou la 30 détermination de l'asynchronie est réalisée au plus tard le jour de l'implantation utérine de l'embryon normalement fécondé ou obtenu par activation

parthénogénique ou par clonage; néanmoins, cette détermination de l'asynchronie est de préférence réalisée à un stade de développement choisi parmi le stade 1 cellule, le stade 2 cellules, le stade 4 cellules, le stade 8 cellules, le stade 16 cellules, le stade morula et le stade blastocyste. De manière préférée, l'évaluation et/ou la détermination de l'asynchronie est réalisée à partir d'embryon(s) ayant atteint le stade blastocyste *in vitro* et dont la 10 cinétique de développement est comparée à celle d'embryons obtenus *in vivo*.

Cette évaluation et/ou la détermination de l'asynchronie de développement T est réalisée de préférence par comptage cellulaire ou détermination de la proportion de cellules de l'embryon organisées en masse cellulaire interne, cellules qui contribueront à la formation du fœtus et d'une partie du placenta. Néanmoins, d'autres technologies connues de l'homme de l'art peuvent être mises en œuvre pour effectuer cette 15 évaluation et/ou détermination, telles par exemple la mise en évidence de l'expression et/ou de l'absence d'expression de marqueurs cellulaires caractéristiques d'un stade de développement embryonnaire particulier.

L'asynchronie de développement T est de préférence 20 supérieure ou égale à 15 heures, de manière préférée supérieure ou égale à 16 heures, supérieure ou égale à 17 heures, supérieure ou égale à 18 heures, supérieure ou égale à 19h00, supérieure ou égale à 20h00, supérieure ou égale à 21h00, supérieure ou égale à 22h00, supérieure ou égale à 23h00, supérieure ou égale à 24h00, supérieure ou égale à 25h00, supérieure ou égale à 26h00, supérieure ou égale à 27h00, supérieure 25

ou égale à 28h00, supérieure ou égale à 29h00, ou supérieure ou égale à 30h00. De manière plus préférée, la dite asynchronie de développement T est d'environ 24 heures.

5 Dans la méthode selon la présente invention, le dit embryon transféré à l'étape b) est cultivé dans les mêmes conditions que le dit premier embryon. Selon un premier mode de réalisation préférée, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule. Selon un 10 second mode de réalisation, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 2 cellules. Selon un troisième mode de réalisation, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 4 cellules. Alternativement, le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 8 cellules, 15 au stade 16 cellules, au stade 32 cellules, au stade 64 cellules, ou à un stade plus avancé du développement.

Les méthodes d'obtention d'animaux mâles vasectomisés sont bien connues de l'homme de l'art, ainsi que les traitements hormonaux destinés à 20 augmenter l'ovulation (voir par exemple : Kennely et Foote, 1965).

Le dit embryon transféré à l'étape b) du procédé selon l'invention se développe en fœtus, de manière préférée le dit fœtus se développe en nouveau-né, et le 25 dit nouveau-né se développe en adulte. C'est donc également un des objets de la présente invention de fournir un embryon, un fœtus, un nouveau-né, un mammifère adulte, excepté l'homme, ou des cellules dérivées de ceux-ci, produit par une méthode comprenant 30 ou incluant la méthode selon l'invention. L'invention concerne également la descendance du dit mammifère adulte selon l'invention. Pour des raisons éthiques, il

est évident que les procédés selon l'invention ne doivent pas être mis en œuvre à des fins de clonage reproductif d'êtres humains.

En fonction des besoins, il peut être intéressant 5 d'arrêter le développement ou la gestation de l'embryon au stade embryonnaire ou fœtal pour dériver les cellules notamment les cellules de la masse cellulaire interne, telles les cellules souches à partir du dit embryon. Par cellules souches de l'embryon, on entend 10 désigner les cellules indifférenciées pluripotentes, cultivables *in vitro* de façon prolongée sans perdre leurs caractéristiques, et qui sont susceptibles de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires lorsqu'elles sont placées dans des conditions de 15 culture définies. Ainsi, lorsque les cellules souches selon l'invention sont des cellules ES, on peut envisager d'induire la différenciation de celles-ci en différents types cellulaires tel par exemple les cellules musculaires, cardiaques, gliales, nerveuses, 20 épithéliales, hépatiques, pulmonaires, pancréatiques. Ainsi, dans le cadre d'un clonage dit "thérapeutique", l'embryon peut être un embryon humain obtenu par un procédé de clonage nucléaire, intra- ou inter- espèces, afin d'obtenir des cellules souches, différenciées ou 25 non, utiles pour le traitement préventif ou curatif de patients nécessitant un tel traitement. Dans ce cas les étapes b) de transfert de l'embryon dans l'utérus et c) d'implantation de l'embryon transféré, du procédé selon l'invention, sont facultatives. L'homme du métier 30 connaît les techniques de culture *in vitro* des cellules de la masse cellulaire interne (voir par exemple WO 97 37009) et des cellules souches embryonnaires en

particulier, pour que celles-ci conservent leur totipotence ou leur pluripotence en culture (Evans et al., 1981; EP 380 646 ; WO 97 30151) ou pour que celles-ci induisent leur différenciation dans un type 5 cellulaire particulier.

L'étape b) du procédé selon l'invention a pour objet le développement de l'animal non-humain depuis le stade embryonnaire jusqu'à son terme. Ceci peut être fait directement ou indirectement. Dans un 10 développement direct, l'embryon réimplanté, transgénique ou non, reconstitué ou non, est simplement laissé se développer dans l'utérus de la femelle porteuse sans qu'aucune intervention étrangère ne survienne jusqu'au terme. Dans un développement 15 indirect, l'embryon peut être manipulé avant que le développement complet ne se réalise. Par exemple, l'embryon peut être divisé, et les cellules développées de manières clonales, dans le but d'augmenter le rendement de production d'animaux clonés. 20 Alternativement ou additionnellement, il est possible d'augmenter le rendement de production d'embryons viables par la mise en œuvre successive du procédé de transfert nucléaire selon l'invention.

- L'embryon, fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, 25 excepté l'homme, ou des cellules dérivés de ceux-ci, obtenus par la mise en œuvre du procédé selon l'invention peuvent aussi être transgéniques. La transgenèse est soit réalisée lors de la culture *in vitro* de l'embryon, soit que l'embryon dérive d'un 30 animal lui-même transgénique. Au sens de la présente invention, on entend désigner par « transgénique » une cellule ou un animal comportant au moins un transgène.

particulier, pour que celles-ci conservent leur totipotence ou leur pluripotence en culture (Evans et al., 1981; EP 380 646 ; WO 97 30151) ou pour que celles-ci induisent leur différenciation dans un type cellulaire particulier.

5 L'étape b) du procédé selon l'invention a pour objet le développement de l'animal non-humain depuis le stade embryonnaire jusqu'à son terme. Ceci peut être fait directement ou indirectement. Dans un développement direct, l'embryon réimplanté, transgénique ou non, reconstitué ou 10 non, est simplement laissé se développer dans l'utérus de la femelle porteuse sans qu'aucune intervention étrangère ne survienne jusqu'au terme. Dans un développement indirect, l'embryon peut être manipulé avant que le développement complet ne se réalise. Par exemple, l'embryon 15 peut être divisé, et les cellules développées de manières clonales, dans le but d'augmenter le rendement de production d'animaux clonés. Alternativement ou additionnellement, il est possible d'augmenter le rendement de production d'embryons viables par la mise en œuvre 20 successive du procédé de transfert nucléaire selon l'invention. L'embryon, fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, excepté l'homme, ou des cellules dérivés de ceux-ci, obtenus par la mise en œuvre du procédé selon l'invention peuvent aussi être transgéniques. L'invention 25 concerne également un embryon de mammifère transgénique excepté l'homme et/ou foetus, nouveau né, mammifère adulte et sa descendance, ou des cellules dérivées de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'invention. La transgenèse est soit réalisée lors de 30 la culture *in vitro* de l'embryon, soit que l'embryon dérive d'un animal lui-même transgénique. Au sens de la présente invention, on entend désigner par « transgénique » une cellule ou un animal comportant au moins un transgène.

On entend désigner par « transgène », du matériel génétique qui a été ou qui va être inséré artificiellement dans le génome d'une cellule d'un animal selon l'invention, particulièrement dans une 5 cellule de mammifère cultivée *in vitro* ou dans une cellule de mammifère vivant et qui va s'y maintenir dans la dite cellule sous forme épisomale. Les méthodes pour générer des cellules transgéniques selon l'invention sont bien connues de l'homme de l'art. 10 Elles incluent de manière non exhaustive, la technologie d'inactivation ciblée d'un ou plusieurs gènes par recombinaison homologue (« Knock-Out »), la technologie d'insertion ciblée d'un ou plusieurs gènes par recombinaison homologue (« Knock-In »), la 15 technologie d'intégration aléatoire d'un transgène par la micro-injection dans le noyau. Le transgène selon l'invention, facultativement compris dans un vecteur linéarisé ou non, ou sous la forme d'un fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par 20 des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau (US 4 873 191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG, 25 polybrène, DEAE-Dextran...), l'infection virale, le sperme.

La réimplantation de l'embryon dans l'utérus d'une femelle porteuse utilise des techniques connues par l'homme du métier. Habituellement, la mère porteuse est 30 anesthésiée et les embryons sont insérés dans l'oviducte. Le nombre d'embryons implantés dans un hôte particulier varie en fonction des espèces mais est

habituellement compatible avec le nombre de nouveau-nés habituellement produits par ladite espèce. Les descendants transgéniques ou non de la mère porteuse sont criblés pour la présence et/ou l'expression du 5 transgène ou d'un marqueur caractéristique des dits descendants en utilisant les méthodes adaptées. Le criblage est souvent réalisé par Southern-blotting ou par analyse en northern-blot en utilisant une sonde qui est complémentaire à au moins une portion du transgène 10 ou du marqueur. Une analyse en Western-blot utilisant un anticorps contre la protéine codée par le transgène ou le dit marqueur peut être employée comme alternative ou comme méthode additionnelle pour cibler la présence du produit protéique codé par le transgène ou le dit 15 marqueur. Typiquement, l'ADN est préparé à partir de cellules de l'animal, et notamment de lymphocytes chez le lapin, puis analysé par southern-blotting ou par PCR pour la présence du transgène. Alternativement, le tissu des cellules susceptibles d'exprimer le transgène 20 ou le marqueur avec le taux le plus élevé sont testés pour la présence et/ou l'expression du transgène ou du marqueur en utilisant l'analyse par Southern-blot ou par PCR. Alternativement, des méthodes additionnelles pour évaluer la présence du transgène ou le marqueur 25 sont les méthodes biochimiques, telles que les tests enzymatiques et/ou immunologiques, les méthodes histologiques pour permettre de détecter la présence d'un marqueur particulier ou de certaines activités enzymatiques, les analyses par cytométrie de flux.

30 C'est également un des objets de la présente invention de fournir un procédé *in vitro* de clonage de mammifère par transfert nucléaire comprenant ou

incluant un procédé selon l'invention de production d'embryons de mammifères non humains qui comprend au moins l'étape d'évaluation et/ou de détermination de l'asynchronie de développement T entre deux embryons de même espèce et de même age. Par transfert nucléaire ou transfert de noyau, on entend désigner le transfert de noyau d'une cellule donneuse provenant d'un animal selon l'invention, de préférence d'un mammifère, à un stade de développement compris entre le stade embryonnaire à adulte, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. En général, la cellule receveuse est un ovocyte. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans l'utérus de femelles porteuses pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture.

Le matériel génétique donneur est introduit par différents moyens dans la cellule receveuse énucléée pour former l'embryon reconstitué. Généralement le matériel génétique donneur est introduit par fusion en utilisant les méthodes telles que (i) l'exposition des cellules à des agents chimiques favorisant la fusion comme l'éthanol, le polyéthylène glycol (PEG) ou d'autres glycols ; (ii) l'utilisation d'agent biochimiques, comme la phytohaemagglutinine (PHA) ; (iii) l'utilisation de virus inactivés, tel le virus Sendaï ; (iv) l'utilisation de liposomes ; (v) l'utilisation de l'électro-fusion. La présente invention ne se limite pas à l'utilisation de ces techniques de fusion et bien que la fusion cellule-

incluant un procédé selon l'invention de production d'embryons de mammifères non humains qui comprend au moins l'étape d'évaluation et/ou de détermination de l'asynchronie de développement T entre deux embryons de même espèce et de même age. C'est également un des objets de la présente invention de fournir un embryons de mammifère, excepté l'homme reconstitué *in vitro*, obtenu par transfert nucléaire et/ou foetus, nouveau-né, mammifère adulte et sa descendance ou cellules dérivées de ceux-ci produit par un procédé 10 comprenant ou incluant le procédé selon l'invention. Par transfert nucléaire ou transfert de noyau, on entend désigner le transfert de noyau d'une cellule donneuse provenant d'un animal selon l'invention, de préférence d'un mammifère, à un stade de développement compris entre le stade embryonnaire à 15 adulte, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. En général, la cellule receveuse est un ovocyte. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans l'utérus de femelles 20 porteuses pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture.

Le matériel génétique donneur est introduit par différents moyens dans la cellule receveuse énucléé pour 25 former l'embryon reconstitué. Généralement le matériel génétique donneur est introduit par fusion en utilisant les méthodes telles que (i) l'exposition des cellules à des agents chimiques favorisant la fusion comme l'éthanol, le polyéthylène glycol (PEG) ou d'autres glycols ; (ii) l'utilisation d'agent biochimiques, comme la phytohaemagglutinine (PHA) ; (iii) l'utilisation de virus inactivés, tel le virus Sendai ; (iv) l'utilisation de liposomes ; (v) l'utilisation de l'électro-fusion. La présente invention ne se limite pas à l'utilisation de ces 30 techniques de fusion et bien que la fusion cellule- 35

cellule soit la méthode préférée pour réaliser le transfert nucléaire McGrath and Solter, 1984; WO 99 37143), d'autres méthodes également préférée peuvent être mise en œuvre, telle que la micro-injection, de 5 préférence la micro-injection du noyau donneur (Wakayama et al., 1998).

Selon la présente invention, la cellule donneuse et la cellule receveuse, de préférence un ovocyte, proviennent du même animal, ou de deux animaux de la 10 même espèce. Selon un autre mode de réalisation, la cellule donneuse et la cellule receveuse proviennent de deux animaux d'espèces différentes.

La combinaison du génome de la cellule donneuse activée et de l'ovocyte activée produit l'embryon 15 obtenu par transfert nucléaire, ou embryon NT (pour « nuclear transfer »), encore appelé embryon reconstitué, termes qui seront utilisés indifféremment dans le présent brevet.

La cellule donneuse selon l'invention peut être 20 n'importe quel type cellulaire qui contient un génome ou du matériel génétique, tel que les cellules somatiques, les cellules germinales, les cellules embryonnaires telles les cellules souches pluripotentes, les cellules souches totipotentes, comme 25 les cellules souches embryonnaires par exemple (cellules ES). Le terme « cellule somatique » se réfère à des cellules diploïdes différenciées. La cellule somatique peut indifféremment provenir d'un animal, ou d'une culture de cellules ou de tissus ayant subi au 30 moins un passage en culture et ayant été congelée ou non. Lorsque la cellule somatique dérive d'un animal, l'animal peut être à n'importe quel stade de

développement, par exemple un embryon, un fœtus ou un adulte. Les cellules somatiques comprennent de préférence et de manière non limitative les fibroblastes (par exemple, les fibroblastes primaires), 5 les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les cellules cumulus, les cellules neurales, les cellules mammaires, les hépatocytes, les cellules de Langerhans. De préférence, les cellules somatiques donneuses sont des cellules cumulus. Les cellules 10 somatiques peuvent être obtenues par exemple par dissociation de tissus par des moyens mécaniques ou enzymatiques (en général par l'utilisation de trypsine ou de protéases) pour obtenir une suspension cellulaire qui est en général cultivée jusqu'à l'obtention d'une 15 monocouche cellulaire confluente. Les cellules somatiques peuvent être récoltées ou préparées pour la cryopréservation et maintenues congelées jusqu'à une utilisation ultérieure. Les cellules donneuses de noyaux sont indifféremment à l'état prolifératif ou à 20 l'état de quiescence. L'état de quiescence qui correspond au stade G₀/G₁ du cycle cellulaire est obtenu chez les cellules en culture par inhibition de contact ou par privation en sérum (Whitfield et al., 1985). L'état prolifératif peut être considéré comme 25 correspondant à tous les autres stades du cycle cellulaire.

Les cellules receveuses selon la présente invention sont de préférence des ovocytes, de manière plus préférée des ovocytes activés. Les ovocytes 30 activés sont ceux qui sont à une étape de la division cellulaire méiotique qui comprend la prophase, l'anaphase, la métaphase, la télophase I et II, de

préférence la métaphase I, l'anaphase I, l'anaphase II, et de manière préférée la télophase II. L'invention concerne également les ovocytes en métaphase II qui sont considérés comme étant dans un état de repos, mais 5 qui peuvent être activés par des techniques connus de l'homme de l'art (WO 00 25578). L'état de développement de l'ovocyte est défini par une inspection visuelle de l'ovocyte sous un grossissement suffisant. Les ovocytes qui sont en télophase II sont par exemple identifiés 10 par la présence d'une protusion de la membrane plasmique correspondant au second globule polaire. Les méthodes pour identifier les différents stades de la division cellulaire meiotique sont connues de l'homme de l'art.

15 Différentes techniques ont été décrites pour activer les ovocytes, telles que l'utilisation d'ionophores de calcium (par exemple la ionomycine) (voir brevet US 5 496 720) qui sont des agents qui augmentent la perméabilité de la membrane des ovocytes 20 et permettent au calcium d'entrer dans les ovocytes. Egalement l'éthanol qui a les mêmes effets peut être utilisé. Egalement l'activation des ovocytes peut être réalisée par des trains de stimulations électriques qui peuvent être utilisés chez le lapin pour contrôler le 25 taux de calcium dans l'ovocyte (Ozil et Huneau, 2001). De préférence, l'état d'activation de l'ovocyte est obtenu par un train d'impulsions électriques puis prolongé chimiquement en cultivant les ovocytes en présence d'inhibiteur de protéine kinase tel le 6- 30 diméthyl-amino-purine (6-DMAP) et/ou en présence d'inhibiteur de la synthèse peptidique tel la cycloheximide (CHX). L'étape d'activation de l'ovocyte

peut être réalisée avant, pendant et/ou après l'étape de fusion du noyau ou de la cellule donneuse avec l'ovocyte receveur.

Les ovocytes peuvent être obtenus par maturation 5 *in vitro* de matériel obtenu par ponction folliculaire d'ovaires recueillis en abattoirs ou par aspiration des ovocytes à partir des follicules des ovaires à des temps déterminés du cycle reproductif d'une femelle ayant été ou non stimulée hormonalement de manière 10 exogène (femelle super-ovulées). Les ovocytes sont maturés *in vivo* ou *in vitro* jusqu'au stade métaphase II ou télophase. Tous les ovocytes maturés *in vivo* doivent être récoltés par lavage de l'oviducte dans un tampon PBS (Phosphate buffered saline). Les ovocytes maturés 15 *in vitro* sont collectés et transférés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum, tel que le sérum de veau fœtal (FCS, « fetal calf serum »). Les ovocytes sont dénudés des cellules cumulus puis énucléés tels que précédemment décrits par Adenot *et al.* (1997).

20 La présente invention porte plus particulièrement sur un procédé de production d'embryons de lapin comprenant les étapes suivantes :

a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de lapin du 25 même âge :
- le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;

- le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ;

5 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ; et

10 b) transférer un embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro*, pas plus âgé que le stade blastocyste dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T$ (+/-25% T) ;

15 c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

20 L'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement compris entre les jours J1 et J10 *post coitum*, de préférence entre les jours J1 et J8 *post coitum*. De manière plus préférée, l'évaluation et/ou la détermination est réalisée *in vitro* au jours

25 J3 et J4 *post coitum*.

Dans le procédé de production d'embryons de lapin selon l'invention, la dite asynchronie de développement T est de 23 heures +/-25%. De manière préférée, ladite asynchronie est d'environ 20 heures, d'environ 21 heures, d'environ 22 heures, d'environ 23 heures ou d'environ 24 heures.

le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ;

5 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ; et

10 b) transférer un embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro*, pas plus âgé que le stade blastocyste dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T$ (+/-25% T) ;

15 c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

L'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement compris entre les jours J1 et 20 J10 *post coitum*, de préférence entre les jours J1 et J8 *post coitum* de manière plus préférée entre les jours J1 et J7 *post coitum*. De manière plus préférée, l'évaluation et/ou la détermination est réalisée *in vitro* au jours J3 et J4 *post coitum*. De manière encore 25 plus préférée, l'évaluation et/ou la détermination est réalisée au jour J5 *post coitum*.

Dans le procédé de production d'embryons de lapin selon l'invention, la dite asynchronie de développement T est de 23 heures +/-25%. De manière préférée, ladite 30 asynchronie est d'environ 20 heures, d'environ 21 heures, d'environ 22 heures, d'environ 23 heures ou d'environ 24 heures.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le dit embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique. Selon un autre mode préféré de réalisation, le dit embryon 5 cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire. De manière plus préférée, le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

10 Dans le procédé de production d'embryons de lapin selon la présente invention, le dit embryon transféré à l'étape b) est de préférence au stade 1, 2 ou 4 cellules, bien que des stades de développement ultérieurs puissent être envisagés.

15 Les embryons de lapin et/ou fœtus, nouveaux-nés, lapins adultes, la descendance des lapins adultes, ou les cellules dérivées de ceux-ci, produits par un procédé comprenant ou incluant la méthode de production d'embryons de lapin selon l'invention sont également 20 l'objet de la présente invention.

L'invention concerne également une méthode *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprenant ou incluant un méthode de production d'embryons de lapins, de préférence transgéniques, selon l'invention. 25 Plus particulièrement cette méthode *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprend les étapes de :

30 a) insertion d'une cellule donneuse de lapin ou d'un noyau de cellule donneuse de lapin dans un ovocyte énucléé de lapine dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;

b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a) ;

c) transfert dudit embryon reconstitué dans une lapine porteuse, de sorte que le l'embryon reconstitué se 5 développe en fœtus, et éventuellement en nouveau né ;

et est caractérisée en ce que la méthode comprend ou inclut un méthode de production d'embryons de lapins selon l'invention. De préférence, le transfert de noyau 10 dans le cytoplasme receveur est effectué par fusion de la cellule donneuse et du cytoplasme receveur ; alternativement, le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par micro-injection du noyau donneur dans le cytoplasme receveur.

15 Pour réaliser avec succès le clonage nucléaire chez des espèces animales jusqu'à présent réfractaires à une telle technologie comme par exemple le lapin et le rat, ou chez des espèces animales difficile à cloner, il est également important que la phase d'activation *in vitro* 20 de l'embryon reconstitué soit la plus brève possible.

En effet, dans des espèces telles le lapin, cette phase S survient très rapidement par rapport à d'autres espèces (Szöllösi, 1966). Le raccourcissement de la 25 procédure d'activation permet que la phase de réPLICATION de l'ADN (phase S) du premier cycle cellulaire puisse survenir, par rapport à l'ovulation, à un moment identique à celui du développement normal.

La présente invention fournit donc des moyens de réduire la phase d'activation *in vitro* de l'embryon 30 reconstitué, afin de garantir une cinétique de développement suffisante pour que l'embryon ne se retrouve pas en dehors de la fenêtre d'implantation

même après désynchronisation. Les inventeurs ont ainsi démontré de manière tout à fait surprenante, que le mélange de deux drogues, l'une étant un inhibiteur de protéine kinase, tel la 6-diméthylaminopurine (6-DMAP), 5 et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique, tel le cycloheximide (CHX), jusqu'ici utilisées séparément pour réaliser l'activation des embryons reconstitués, permettait d'obtenir une activation plus efficace sur des temps plus court tout en limitant les 10 effets secondaires connus de ces drogues notamment sur l'initiation de la phase S et la réplication de l'ADN. Aussi, dans le procédé selon l'invention, la phase d'activation au cours de la culture *in vitro* est réalisée par adjonction de préférence simultanée, ou 15 successive ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique. De manière préférée, la dite activation est réalisée par 20 adjonction simultanée de 6-DMAP et de cycloheximide (CHX). Les concentrations en 6-DMAP et CHX pour réaliser une telle activation chez le lapin sont respectivement comprises entre 1 et 5 millimolaires (mM), de préférence 2 mM et 1 à 10 microgrammes (μ g) de 25 préférence 5 μ g par ml. La durée de l'activation s'étend de préférence de 30 minutes à 2 heures, de préférence une heure. L'homme du métier adaptera sans difficulté ces paramètres en fonction pour d'autres mammifères que le lapin.

30 La présente invention porte donc également sur un procédé d'activation d'embryon reconstitué ou non, transgénique ou non, caractérisé en ce qu'il comprend

l'étape d'ajouter au milieu de culture du dit embryon, successivement, simultanément, ou de manière décalée dans le temps, au moins un inhibiteur de protéine kinase, plus particulièrement impliquée dans la reprise 5 de la meiose, et de préférence la 6-DMAP, et au moins un inhibiteur de la synthèse protéique, de préférence la cycloheximide (CHX).

La présente invention porte aussi sur un procédé *in vitro* de clonage de mammifère tel que précédemment 10 décrit, comprenant les étapes: (i) d'insertion d'une cellule donneuse ou d'un noyau de cellule donneuse dans un oocyte énucléé de mammifère de la même espèce ou d'une espèce différente de celle de la cellule donneuse, dans des conditions permettant d'obtenir un 15 embryon reconstitué ; (ii) d'activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape (i) ; et de (iii) transfert dudit embryon reconstitué dans une femelle porteuse de mammifère, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus, caractérisé en ce 20 que la dite activation est réalisée par adjonction successive, simultanée, ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase, de préférence la 6-DMAP, et d'au moins un inhibiteur de la synthèse 25 protéique, de préférence la cycloheximide (CHX). De préférence, la dite activation est réalisée par adjonction simultanée de 6-DMAP et de CHX pour une durée d'activation qui s'étend de préférence de 30 minutes à 2 heures, de préférence une heure.

30 C'est également un des objets de la présente invention de fournir une méthode de production d'une protéine recombinante par un animal transgénique,

notamment de lapin, obtenu par un procédé selon l'invention. Le transgène qui code pour la dite protéine recombinante n'est pas limité à une séquence particulière d'ADN. La séquence d'ADN du transgène peut 5 être d'une origine purement synthétique (par exemple réalisée en routine à partir d'un synthétiseur d'ADN), ou peut dériver de séquences d'ARNm par reverse transcription, ou peut dériver directement de séquences d'ADN génomique. Lorsque la séquence d'ADN dérive de 10 séquences d'ARN par reverse transcription, celle-ci peut contenir ou non tout ou partie de séquences non codantes telles les introns, selon que la molécule d'ARN correspondante a ou non subi, partiellement ou totalement, un épissage. Le transgène peut être aussi 15 petit que quelques centaines de paires de bases d'ADNc ou aussi large qu'une centaine de milliers de paires de bases d'un locus génique comprenant la séquence codante exonique-intronique et les séquences de régulation nécessaires à l'obtention d'une expression contrôlée de 20 manière spatio-temporelle. De préférence, le segment d'ADN recombiné a une taille comprise entre 2,5 kb et 1 000 kb. Quoi qu'il en soit, les segments d'ADN recombinés peuvent être inférieurs à 2,5 kb et supérieurs à 1 000 kb. Le transgène ou la séquence 25 d'ADN de la présente invention est de préférence sous forme native, c'est-à-dire dérivée directement d'une séquence d'ADN exogène naturellement présente dans une cellule animale. Cette séquence d'ADN sous forme native peut être modifiée par exemple par insertion de sites 30 de restriction nécessaires au clonage et/ou par insertion de sites de recombinaison site-spécifiques (séquences lox et flp). Alternativement, la séquence

d'ADN de la présente invention peut avoir été créée artificiellement *in vitro* par les techniques de l'ADN recombinant, en associant^z par exemple des portions d'ADN génomique et d'ADNc.

5 Le transgène qui code pour la dite protéine recombinante contient de préférence des séquences de régulation appropriées pour diriger et contrôler l'expression des gènes codant desdits polypeptides dans le ou les type(s) cellulaire(s) approprié(s). Par 10 éléments contrôlant l'expression génique, on entend désigner toutes les séquences d'ADN impliquées dans la régulation de l'expression génique c'est-à-dire essentiellement les séquences régulatrices de la transcription, de l'épissage, de la traduction. Parmi 15 les séquences d'ADN régulatrices de la transcription, il convient de citer la séquence promotrice minimale, les séquences amonts (par exemple, la boîte SP1, l'IRE pour «interferon responsive element»,...), les séquences activatrices («enhancers»), éventuellement les 20 séquences inhibitrices («silencers»), les séquences insulateurs («insulators»), les séquences d'épissage. Les éléments contrôlant l'expression génique permettent soit une expression constitutive, ubiquitaire, inductible, spécifique d'un type cellulaire («tissu- 25 spécifique») ou spécifique d'une étape du développement. Ces éléments peuvent être ou non hétérologues à l'organisme, ou être naturellement présents ou non dans le génome de l'organisme. Il est évident qu'en fonction du résultat recherché, l'homme 30 du métier choisira et adaptera les éléments de régulation de l'expression des gènes. Pour diriger l'expression du transgène dans un fluide biologique de

l'animal, tel le lait, la séquence régulatrice de la transcription utilisée est sélectionnée dans les séquences promotrices des gènes actifs spécifiquement dans les cellules sécrétant ces fluides biologiques,

5 telles les cellules des glandes mammaires par exemple pour diriger l'expression dans le lait. Parmi les fluides biologiques préférés, il convient de citer le lait, le sang, le sperme, l'urine. De manière préférée, la protéine recombinante selon l'invention est sécrétée

10 par les cellules des glandes mammaires dans le lait. Ainsi, les séquences promotrices ou promoteurs préférés sont ceux qui sont à la fois efficace et spécifique dans le tissu mammaire. Par efficace, on entend que les promoteurs sont forts dans les tissus mammaires et

15 peuvent supporter la synthèse de grande quantité de protéine sécrétée dans le lait. Parmi, ces promoteurs il convient de citer les promoteurs de la caséine, de la lactoglobuline, de la lactalbumine, qui incluent de manière non limitative les promoteurs α -, β -, et γ -

20 caséine, le promoteur de l' α -lactalbumine et les promoteurs de la β -lactoglobuline. Les promoteurs préférés proviennent des rongeurs, souris ou rat, du lapin, du porc, de la chèvre, du mouton. De manière plus préférée, le promoteur est celui d'un gène de la

25 protéine acide du petit lait (WAP, pour whey acidic protein), et le promoteur WAP le plus préféré est un promoteur WAP de lapin décrit dans le brevet US 5 965 788, le promoteur WAP de porc, le promoteur WAP de souris.

30 L'utilisation d'un animal transgénique, notamment d'un lapin transgénique, obtenu par un procédé selon l'invention pour la production de protéines

recombinantes d'intérêt, de préférence dans le lait de l'animal, est un objet de la présente invention. La protéine recombinante d'intérêt peut être n'importe quelle protéine, par exemple une protéine thérapeutique 5 telle que la α -, β -, δ -globine, les facteurs de coagulation sanguine (facteurs VIII et IX), les récepteurs de surface cellulaire, les anticorps, les enzymes, etc... et autres protéines nécessaires pour par exemple corriger des défauts hérités ou acquis chez un 10 patient.

L'invention concerne également l'utilisation d'un animal transgénique, de préférence d'un lapin transgénique, susceptible d'être obtenu par la méthode selon l'invention, comme modèle d'étude de pathologies 15 humaines. A titre d'exemple de pathologies humaines, il convient de citer la mucoviscidose, l'athérosclérose, les cancers, les maladies du métabolisme, les pathologies oculaires. Compte tenu des polymorphismes génétiques présents dans la population, il peut être 20 intéressant pour analyser ou obtenir une réponse physiologique, physiopathologique ou comportementale caractéristique que les animaux transgéniques selon l'invention, et notamment les lapins transgéniques selon l'invention présentent des fonds génétiques 25 différents. Ainsi, les lapins selon l'invention pourront être sélectionnés dans les races New-Zealand, Fauve-de-Bourgogne, Argenté-de-Champagne, Californiennes, Géant-de-Bouscat, toutes races dont les spécificités zoologiques sont définies dans un 30 standard officiel (Le lapin de race, Ed. 2000 Fédération Française de Cuniculture (Ed.) et leurs

croisements notamment ceux qui donnent lieu à des souches commercialisées telle la souche GD22/1077.

5 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants.

10

FIGURES :

FIGURE 1 : Images confocales d'un embryon reconstitué (NT) au stade 1 cellule immunomarqué en utilisant un anticorps anti-alpha tubuline (vert) et de l'ADN avec de l'iodure de propidium (rouge).

(A). Avant le second tour d'électro-stimulation, la chromatine apparaît condensée dans les chromosomes et accrochée au fuseau ; les flèches dans l'encart (vue agrandie 3 fois de la région du fuseau) indique des chromosomes individuels proches des pôles du fuseau. (B). Suite au retrait du CHX et du 6-DMAP, 72% des embryons reconstitués (NT) (n=25) présentent déjà un petit noyau et un réseau micro-tubulaire interphasique formé (flèche). (C). 1 heure après le retrait des drogues, tous les embryons reconstitués (NT) sont en interphase et 71% (n=17) d'entre eux présentent un unique et large noyau ressemblant au pronucléus comme observé dans les zygotes de lapin. Barre = 50 µm.

30

FIGURE 2 : Développement de blastocystes reconstruits de lapin avec des cellules cumulus ou dérivés d'œufs activés *in vitro* ou fécondés *in vivo*.

(A), Augmentation *in vitro* du nombre de cellules entre les jours J3 et J4 d'embryons récupérés soit directement à partir de donneurs (*in vivo*, n=27), soit cultivés à partir du stade une cellule (environ 20 heures post HCG), soit après accouplement naturel (*in vitro*, n=44) soit par transfert nucléaire (n=31, NT); (B), Diamètre moyen et longueur moyenne des disques embryonnaires au jour J8 ; (C), exemple de blastocyste reconstruit (obtenu par transfert nucléaire) retardé et récupéré au jour J8 après un transfert au stade 4 cellules dans une femelle receveuse asynchrone (- 16 heures) ; le disque embryonnaire (grande flèche) est visible mais le blastocyste est encore entouré par une fine couche de protection de l'embryon (petite flèche) qui devrait normalement avoir disparu au jour J7 (Denker, 1981). Des embryons fécondés *in vivo* sont récoltés soit directement à partir de donneurs (*in vivo*) ou suite à un transfert dans des femelles receveuses au stade 1 cellule (contrôle). Les embryons fécondés *in vitro* sont collectés au stade 1 cellule (*in vitro*).

FIGURE 3 : Représentation schématique du protocole utilisé pour le développement *in vivo* des embryons reconstitués à partir des cellules donneuses cumulus. Seuls les embryons transférés au stade 4

cellules dans des femelles asynchrones (à 22 heures) se développent à terme.

FIGURE 4 : Des lapins nés par transfert nucléaire. (A),
5 lapin cloné N° 0107 avec les contrôles correspondants : **A1**, expression de la protéine auto-fluorescente eGFP (tête de flèche) détectée par microscopie confocale à partir de follicules de poils obtenus par une biopsie d'oreille à 1 mois ;
10 **A2**, idem mais la détection est réalisée par microscopie à transmission lumineuse ; **A3**, amplification du transgène eGFP (PCR 2) et de l'exon 10 du gène CFTR utilisé comme contrôle de qualité de l'ADN (PCR 1) ; ceci confirme que le
15 lapin N° 0107 (lignes 8 et 9) et sa descendance N° 107B (qui est décédé 1 jour après la naissance ; lignes 10 et 11) dérivent de cellules cumulus de donneurs (lignes 12 à 13) ; **B1-B2**, 3 autres lapins de 2 autres portées différentes ; les lapins dans
20 **B1** ont maintenant prouvé qu'ils étaient fertiles.

EXEMPLES

1) MATERIELS ET METHODES5 1.1) Source des ovocytes et des cellules cumulus

Des ovocytes en métaphase II (MII) sont collectés à partir de lapines « New-Zealand » superovulées par injections d'hormones FSH suivies d'une injection d'hormone HCG, accouplées à un mâle vasectomisé 16 heures après une injection de chorio-gonadotrophine Humaine (hCG). Les ovocytes sont ensuite incubés dans 0,5% de hyaluronidase pendant 15 min (Sigma) pour éliminer les cellules cumulus par un pipetage doux. Pour le transfert nucléaire, les ovocytes sont énucléés tels que décrits précédemment (Adenot et al., 1997). Simultanément, des cellules cumulus sont prélevées soit sur des lapines de race « New-Zealand » ou des lapines F1 obtenues par croisement entre des lapins de race « New-Zealand » croisés avec des lapins de race « Fauves de Bourgogne » ou des femelles lapines F1 transgéniques « New-Zealand » comportant une construction d'ADN avec une séquence codante pour la protéine de fluorescence verte augmentée (eGFP) placée sous le contrôle d'un promoteur EF1 (« elongation factor 1 ») ou d'un promoteur HMG. La fluorescence eGFP et les réactions d'amplification PCR sont utilisées comme marqueurs des cellules donneuses cumulus. Les cellules cumulus sont ensuite conservées à 38°C dans du PBS sans calcium ni magnésium supplémenté avec 1% de PVP 40 000 (polyvinyle pyrrolidone (PVP)) avant leur utilisation comme cellules donneuses de noyaux.

1.2) Activation des ovocytes et transfert nucléaire

Pour reconstruire par transfert nucléaire (NT) les 5 embryons, des cellules cumulus individuelles sont insérées par micro-manipulation sous la zone pellucide des ovocytes énucléés. Les embryons obtenus par transfert nucléaire (embryons NT) et les ovocytes MII sont activés de la manière suivante : 2 phases de 10 stimulations électriques sont appliquées à 1 heure de décalage avec un stimulateur Grass (3 pulses de courant continu de $3,2 \text{ kV} \times \text{cm}^{-1}$ pendant $20 \mu\text{s}$ chacun dans du mannitol 0,3 M contenant 0,1 mM de Ca^{2+} et de Mg^{2+}), la première phase induisant la fusion de l'ovocyte et de 15 la cellule cumulus. Les embryons reconstitués sont maintenus une heure dans un milieu de culture à 38°C . Après la seconde phase, les embryons NT sont incubés en présence de la cycloheximide (5 $\mu\text{g/ml}$) et de 6-DMAP (2 mM) dans du milieu M199 pendant 1 heure ; les ovocytes 20 sont incubés avec l'une de ces drogues ou les deux simultanément pendant 1 heure. Après un lavage extensif pour enlever les drogues, les cellules sont à nouveau remises en culture dans une microgoutte de 50 μl de milieu B2 supplémenté avec 2,5% de sérum de veau fœtal 25 (FCS) sous de l'huile minérale (Sigma M8410) à 38°C sous une atmosphère saturée en 5% CO_2 . Ce protocole d'activation est appliqué aux embryons NT, environ 18 à 20 heures après l'accouplement des donneurs.

L'organisation microtubulaire et la chromatine dans les embryons NT au stade 1 cellule sont observés tel que précédemment décrit (Adenot et al., 1997), excepté que l'état de fixation dure 20 min à 37°C et que le 5 milieu de montage est du Vectashield (Vector Laboratories). Les taux de clivage des embryons NT et des parthénotes sont évalués de 21 heures à 23 heures après l'électro stimulation. Les taux de développement 10 jusqu'au stade blastocyste sont estimés après une culture *in vitro* de 3 à 4 jours. Pour l'évaluation du nombre de cellules, les embryons sont fixés tel que précédemment décrit, puis colorés avec du Hœchst 33442 à 1 µg/ml puis montés sur des lames à puits dans du Vectashield et analysés sous épifluorescence. Les 15 contrôles sont des blastocystes qui se sont soit développés *in vitro* à partir d'un embryon 1 cellule collecté à partir d'une lapine superovulée ou qui se sont développés *in vivo* à partir de femelles non superovulées croisées avec un mâle puis sacrifiées 3 ou 20 4 jours plus tard.

1.4) Développement *in vivo* :

Les femelles receveuses sont croisées avec un mâle vasectomisé soit au même moment ou 16 heures ou 22 25 heures après le croisement des femelles donneuses d'ovocytes avec un mâle vasectomisé. Dans le cas de femelles synchrones (c'est-à-dire croisées au même moment que les femelles donneuses d'ovocytes) les 30 embryons reconstitués NT sont transplantés au stade 1 cellule 1 à 3 heures après l'activation ou sont transplantés au stade 4 cellules après une culture pendant la nuit. Dans le cas de femelles receveuses

asynchrones (c'est-à-dire croisées 16 heures ou 22 heures après les femelles donneuses d'ovocytes), les embryons reconstitués NT sont transplantés soit au stade 1 cellule ou soit au stade 4 cellules après une 5 culture sur la nuit. Les embryons sont transplantés chirurgicalement à travers l'infondibulum dans chacun des oviductes des femelles receveuses. Le taux d'implantation de parthénotes et d'embryons NT est évalué après sacrifice des femelles receveuses au jour 10 J8. La grossesse est déterminée par palpation 13 ou 14 jours après la transplantation des embryons et les femelles receveuses enceintes sont accouchées par césarienne 31 jours après l'accouplement.

15 1.5) Analyse PCR

La présence de marqueurs transgéniques GFP est détectée par PCR en utilisant un primer-sens (SEQ ID N° 1) et une amorce antisens (SEQ ID N° 2) (GENSET, France). Pour contrôler la qualité de l'ADN, la PCR est 20 réalisée sur 300 à 400 ng d'ADN préparés avec le kit d'extraction de tissus (QIAGEN, USA) avec l'amorce-sens (SEQ ID N° 3) et l'amorce antisens (SEQ ID N° 4) qui couvre l'exon 10 du gène CFTR du lapin (GENSET, France). Les amplifications sont réalisées avec de la 25 Taq Polymérase (Q.BIOGEN, France) à travers 35 cycles d'amplification, de la façon suivante : 94°C pendant 20 s, 57°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. La taille des fragments amplifiés est de 240 paires de bases pour le gène CFTR et de 350 paires de bases pour le 30 transgène eGFP. Les fragments de PCR sont séparés sur un gel d'agarose à 1,5% dans du TAE (Tris Acétate EDTA) puis colorés avec du bromure d'éthydium et sont

comparés à une échelle de 100 paires de bases utilisée comme marqueur de taille (BIOLABS, Angleterre). Les contrôles négatifs sont constitués par de l'eau bidistillée et de l'ADN de la femelle receveuse, alors 5 que le contrôle positif correspond à de l'ADN de fibroblaste transgénique cultivé.

2) ACTIVATION, ASPECT NUCLEAIRE ET DEVELOPPEMENT IN VITRO DES EMBRYONS DE LAPIN RECONSTITUES OBTENUS PAR TRANSFERT NUCLEAIRE

10 Les inventeurs ont précédemment décrit (Adenot et al., 1997) que les ovocytes ovulés de lapines vieillis dans les oviductes avant leur collecte (vieillissement *in vivo*), forment des pronucléi durant une période 15 d'une heure après l'activation par un stimuli: ceci correspond à un temps 3 fois plus rapide que lorsque les ovocytes fraîchement ovulés sont cultivés jusqu'au même âge (vieillissement *in vitro*).

20 Lorsque des ovocytes sont activés en présence de l'inhibiteur de la phosphorylation protéique (6-DMAP), ces ovocytes forment des pronucléi plus rapidement que le feraient des ovocytes âgés *in vivo* (données non publiées des inventeurs). Ainsi, les conditions 25 d'activation peuvent altérer de manière importante le timing de la formation nucléaire des zygotes de lapin. A l'inverse, d'autres espèces de mammifères, le zygotes de lapin a la particularité d'entrer dans la phase S très tôt après l'activation (Szöllösi, 1966). Ceci indique que la durée de la métaphase II (MII) jusqu'à 30 la transition interphasique doit être examinée avec attention lorsque l'on établit un protocole d'activation pour le transfert nucléaire dans cette

espèce. Dans le clonage somatique de mammifère, le 6-DMAP ou l'inhibiteur de synthèse protéique cycloheximide (CHX) sont souvent utilisés suite à l'activation d'embryons obtenus par transfert nucléaire 5 (NT) par des agents augmentant la concentration en calcium intracellulaire. Ces drogues favorisent l'inactivation de cdc2/cyclin-B et des kinases ERK/MAP impliquées dans l'arrêt des ovocytes au stade MII. La cycloheximide néanmoins inhibe également la réplication 10 de l'ADN dans les ovocytes activés (Moos et al., 1996 ; Soloy et al., 1997) et la 6-DMAP peut également affecter l'activité kinase connue pour être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Meyer et al., 1997). Les inventeurs ont donc considérés qu'une 15 incubation d'1 heure avec du CHX et/ou du 6-DMAP après une activation des ovocytes pourrait être suffisante pour l'espèce lapin. Les expériences précédentes, infructueuses, de clonage somatique du lapin utilisaient une incubation en 6-DMAP de 2 (Yin et al., 2000 ; Dinnyés et al., 2001) ou de 4 (Mitalipov et al., 1999) heures. Dans la présente invention, les inventeurs ont trouvé que des ovocytes MII activés électriquement, exposés 1 heure à de la CHX ($n = 48$), 6-DMAP ($n = 48$) ou à un mélange des 2 drogues ($n = 25$ 20 130) se clivent de manière efficace au stade 2 cellules (94%, 96% et 100% respectivement). Néanmoins, il se développe au stade blastocyste de manière significativement meilleure lorsqu'ils sont exposés simultanément au CHX et au 6-DMAP (89%) ou au 6-DMAP 25 seul (79%) que au CHX seul (50%) (tableau 1). Ces taux sont supérieurs (Dinnyés et al., 2001 ; Mitalipov et al., 1999) ou similaires (Yin et al., 2000) à ceux 30

rapportés par d'autres chercheurs qui utilisent pour traiter les ovocytes la 6-DMAP pendant 2 heures après l'électro stimulation (Yin et al., 2000 ; Dinnyés et al., 2001) ou pendant 4 heures après 5 l'électrostimulation (Mitalipov et al., 1999 ; Dinnyés et al., 2001) ou qui utilisent l'ionomycine (Mitalipov et al., 1999).

Les inventeurs ont utilisé un protocole d'activation utilisant un mélange CHX/6-DMAP pour 10 reconstruire des embryons NT avec un noyau fraîchement collecté de cellules-cumulus. Les inventeurs ont choisi ce type de cellules, considéré comme arrêté au stade G1/G0 de leur cycle cellulaire, parce que ces cellules ont été initialement utilisées comme un modèle pour 15 démontrer la faisabilité du clonage somatique (Wakayama et al., 1998 ; Wells et al., 1999). Les observations au microscope confocal d'embryons NT fixés juste avant la seconde phase d'électro-stimulation montrent que la chromatine est condensée en chromosomes et associée au 20 fuseau (N = 14 ; fig. 1A). Cette condensation résulte de la haute activité MPF dans le cytoplasme receveur (Campbell et al., 1996). Quoiqu'il en soit, un agencement typique des chromosomes caractéristiques des ovocytes MII n'a pas été observé. Au lieu de cela, des 25 chromosomes collapsés forment un plateau métaphasique mal aligné et des chromosomes individuels sont parfois observés proches des pôles du fuseau (fig. 1A, insert). Cette structure chromatinienne inhabituelle, probablement liée au stade nucléaire du noyau donneur 30 (Wakayama et al., 1998) est compatible avec un développement jusqu'à son terme chez la souris (Wakayama et al., 1998 ; Wakayama et al., 1999). Après

avoir éliminé les drogues, les inventeurs ont observé que 72% des embryons de lapin NT (N = 25) exhibaient déjà une chromatine interphasique et une organisation microtubulaire (fig. 1B). 1 heure après, tous les 5 embryons étaient en interphase et 71% d'entre eux (N = 17) montraient une structure pronucléaire large et unique (fig. 1C) comme celle observée chez les zygotes de lapin (données non montrées). De ces observations, les inventeurs ont conclu que la transition métaphase 10 II vers interphase est rapide dans les embryons NT reconstitués et conduisent à un remodelage apparemment normal de la chromatine étrangère par le cytoplasme de l'ovocyte.

Lorsque les embryons NT sont laissés en culture 15 (n = 135), 93% d'entre eux se clivent au stade deux cellules et 47% d'entre eux se développent en blastocystes. Les taux de développement pré-implantatoires préalablement obtenus dans des expériences de clonage somatique chez le lapin étaient 20 bien plus bas (16 à 30%) que ce soit avec des cellules-cumulus (Yin et al., 2000) ou des fibroblastes donneurs (Dinnyés et al., 2001 ; Mitalipov et al., 1999).

Les embryons NT atteignent le stade blastocyste *in vitro* au jour J3 (J3) comme le font les zygotes et les 25 parthénotes, mais leur croissance déterminée par le nombre compté de cellules, est plus lente, ce qui a pour conséquence que ces embryons NT ont un développement au jour J4 d'environ 1 jour en arrière (fig. 2A).

30

3) DEVELOPPEMENT *IN VIVO* D'EMBRYONS DE LAPIN OBTENUS
PAR TRANSFERT NUCLEAIRE

Dans les espèces de lapins, le développement *in vivo* des blastocystes est rapide et important. Ce développement se propage sur les parois avoisinantes de l'utérus, de telle sorte que la position individuelle des blastocystes devient rapidement reconnaissable en tant que sites d'implantation dès le stade J6 dans les cornes utérines de femelles receveuses sacrifiées (Denker, 1981). Les inventeurs ont trouvé que des embryons obtenus par transfert nucléaire pouvaient former des sites d'implantation à un transfert au stage 1 ou 4 cellule(s) dans l'utérus de femelles receveuses synchrones (c'est-à-dire croisées avec un mâle vasectomisé au même moment que les femelles donneuses de noyaux). Néanmoins, le nombre de sites d'implantation des blastocystes obtenus par transfert nucléaires (NT) est moins important qu'avec ceux des contrôles et des parthénotes (tableau 2) ; aucune structure embryonnaire obtenue par NT ne peut être mise en évidence suite à la dissection des cornes utérines au jour J8.

Lorsque des embryons NT au stade 4 cellules sont transférés dans des femelles receveuses asynchrones croisées 16 heures après les femelles donneuses (fig. 3), le taux d'implantation augmente (tableau 2) et n'est pas significativement différent de celui obtenu avec les contrôles (transfert synchrone) ou avec les parthénotes (transfert synchrone ou asynchrone). Dans ces conditions, les inventeurs ont pu collecter des embryons au stade blastocyste avancé ; ces embryons présentent un disque embryonnaire plat (fig. 2C grande flèche) d'environ 1,1 mm de longueur ($n = 8$, gamme 0,8 - 1,5 mm) et tous sauf un sont encore

clairement entourés d'une fine couche de protection de matériel extra-cellulaire (petite flèche, fig. 2C) qui a été progressivement apposée à la surface des embryons de lapin tout au long du transit dans le tractus génital femelle. La dissolution de ces muco-substances dépend des actions synergiques des blastocystes et de l'endomètre (Denker et al., 1975) et contribue à générer une fenêtre très étroite d'implantation dans cette espèce. Lorsque ces embryons sont examinés avec attention à partir du pôle abembryonique, aucune désorganisation apparente de la couverture ne peut être observée indiquant que les blastocystes obtenus par transfert nucléaire étaient équivalents pour le moins aux embryons normaux au stade J7 (Denker, 1981). Aucune des femelles receveuses transplantées, soit de manière synchrone ou asynchrone (16 heures) ne peut être diagnostiquée enceinte à la mi-gestation (tableau 3), même lorsqu'on leur a transféré des embryons « helpers » non manipulés d'une autre race de lapin (fauves de Bourgogne ; données non montrées) ou lorsqu'on leur a transféré un excès d'embryons obtenus par transfert nucléaire (jusqu'à 39 par femelle, données non montrées). Ces observations suggèrent que seulement très peu des blastocystes obtenus par transfert nucléaire peuvent s'implanter parce que leur développement n'est pas retardé. Ceci a été confirmé par le fait que, lorsqu'on effectue un examen au jour J8, les inventeurs peuvent observer dans un cas un blastocyste obtenu par transfert nucléaire déjà adhérent à l'épithélium utérin (données non montrées), ce blastocyste étant très similaire en taille au contrôle normalement implanté (gamme 1,1 à 2,6 mm, fig. 30).

2B). Bien qu'ils soient plus petits que les embryons normaux *in vivo* au stade J8 (Gottschewski et al., 1973) (fig. 2B), ces contrôles peuvent normalement se développer jusqu'à terme suite à un transfert au stade 5 1 ou 4 cellule(s) dans des femelles receveuses synchrones (données non montrées).

Les inventeurs ont ainsi étendu l'asynchronie entre des femelles donneuses et des femelles receveuses de 16 à 22 heures (fig. 3). Une telle asynchronie marquée à 10 des stades de clivage précoce du développement n'a jamais été réalisée par le passé avec des embryons obtenus par transfert nucléaire et est compatible avec un développement à terme de zygotes. Dans ces conditions, 10/27 (37%) des femelles receveuses 15 asynchrones (22 heures) ont été diagnostiquées enceintes après palpation au jour J14. A partir de ces femelles, 4 (40%) ont donné naissance au jour J31 à 6 lapereaux vivants (fig. 4) pesant de 30 à 90 g (poids moyen : 65 g). Une telle variabilité est également 20 observée lorsque les lapereaux sont nés d'une portée d'une taille réduite (de 1 à 4 fœtus) ce qui survient de manière occasionnelle dans l'animalerie notamment quand les lapins sont issus d'embryons micro-injectés avec des solutions d'ADN au stade pro-noyau. 25 L'expression du marqueur transgénique eGFP à partir des follicules pileux dès la naissance (fig. 4) et à partir de lymphocytes obtenus à l'âge de 1 mois environ (données non montrées) confirme que les lapereaux résultent bien de transfert nucléaire de cellules-cumulus. Des lapereaux ayant une apparence 30 morphologique normale (poids respectifs : 90 et 30 g) sont décédés 1 jour après la naissance et, pour l'un

d'entre eux, les inventeurs suspectent une déficience dans le processus d'adoption par la mère allaitante. Les 4 autres lapereaux se sont développés normalement et deux d'entre eux (fig. 4, en bas à gauche) se sont 5 reproduits et ont donné naissance à respectivement 7 et 8 jeunes lapereaux sains suite à un croisement naturel.

La présente invention permet de surmonter les limitations rencontrées lors du clonage de certaines 10 espèces de mammifère considérée comme difficiles à cloner jusqu'à présent, telles le lapin (Solter 2000). Ces limitations peuvent être surmontées en prenant en compte les différences apparemment ténues entre les développements de l'ovocyte et embryonnaire précoce. 15 Les résultats présentés par les inventeurs indiquent donc que le clonage somatique peut être réalisé avec succès dans n'importe quelle espèce de mammifère. De manière surprenante, un timing écourté, des procédures d'activation classiques et une asynchronie de presque 1 20 jour lors du transfert des embryons reconstruits dans des femelles receveuses retardées compensent le retard du développement qui existe déjà au moment du premier clivage et semblent avoir un effet décisif sur l'obtention d'embryons de lapins obtenus par transfert 25 nucléaire.

Le procédé d'obtention de lapin par clonage nucléaire est d'un grand intérêt industriel notamment pour l'obtention de lapins transgéniques exprimant une 30 protéine d'intérêt, ou pour la genèse de modèle animaux de pathologies humaines.

5 Tableau 1. Effet de différents traitements sur le développement *in vitro* après activation parthénogénique d'ovocytes de lapine

<u>Traitements</u>		<u>Nombre d'ovocytes utilisés</u>	<u>Nombre d'ovocytes clivés (%)</u>	<u>Nombre de blastocystes (%)</u>
Activation électrique 1 heure d'incubation dans du M 199 +				
CHX	30 min	48	41 (85.4)	19 (39.6)
CHX	1 h	48	45 (93.7)	24 (50.0)
CHX	4 h	48	47 (97.9)	25 (52.1)
6-DMAP	30 min	48	43 (89.6)	32 (66.7)
6-DMAP	1 h	48	46 (95.8)	38 (72.9)
6-DMAP	1 h	48	47 (97.9)	35 (72.9)
CHX/6DMAP	30 min	52	45 (93.7)	37 (71.1)
CHX/6DMAP	1 h	130	130 (100.0)	116 (89.6)
CHX/6DMAP (ovocytes reconstitués)	1 h	36	36 (100.0)	32 (88.9)

10 (CHX : cycloheximide ; 6-DMAP : 6-diméthylaminopurine)

Tableau 2. Implantation après transfert dans des femelles receveuses synchrones et asynchrones (-16 heures)

Type d'embryons	Type de femelles receveuses	Femelles receveuses enceintes au jour J8/Total des Femelles receveuses transférées	Nombre de sites d'implantation /Nbre d'embryons transférés dans des femelles receveuses enceintes (%)	Nombre de blastocystes implantés / nombre de femelles receveuses
Contrôle	Synchrone	5/6	15 / 54 (27,8%)	9/9
Parthénotes	Synchrone	8/20	17 / 78 (21,8%)	0/1
NT	Synchrone	5/16	7 / 91 (7,7%)	0
Parthénotes	asynchrone	5/9	15 / 44 (34,1%)	3/3
NT	asynchrone	6/13	12/ 59 (20.3%)	1/7

Tableau 3. Développement *in vivo* d'embryons reconstitués de lapin par transfert nucléaire somatique

Type de femelles receveuses	Synchrone	Asynchrone (-16h)	Asynchrone (-22h)
Stade des embryons	1-cellule	1-cellule	4-cellules
Nombre d'embryons reconstitués	554	523	775
[Nombre de réplicats]	[19]	[18]	[27]
Nombre d'embryons fusionnés	427	346	612
[% provenant d'embryons reconstitués]	[77.1]	[66.2]	[79.0]
Nombre total transférés	367	346	371
[% provenant d'embryons fusionnés]	[100.0]	[100.0]	[60.6]
Nombre de femelles receveuses transférées	19	18	27
Nombre de femelles receveuses enceintes au jour J14 [de femelles transférées]	0	0	10 [37.0]
Nombre de femelles receveuses ayant mis bas [% de femelles transférées]	0	0	4* [14.8]
Nombre de lapereaux nés			6
[% d'embryons transférés]			[1.6]
Nombre de lapereaux vivants au moment du sevrage			4
Poids moyens des lapereaux à la naissance (en gr)			65 ± 20 [†]

* avortements entre les jours J15 et J29 de la grossesse (13 cotylédons et fœtus dégénérés ont été récupérés)

† poids moyens des lapereaux à la naissance dans l'animalerie des inventeurs, pour des portées de nombre équivalent : 55.8gr ± 17.0

REFERENCES

Adenot *et al.* (1997) *Mol. Reprod. Dev.* **46**, 325-336.

Baguisi *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* **17**, 456-461.

5 Bromhall *et al.* (1975) *Nature* **258**, 719-722.

Campbell *et al.* (1996) *Rev. Reprod.* **1**, 40-46.

Chen *et al.* (2001) *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1771-1788.

Denker *et al.* (1975) *Cytobiol.* **11**, 101-109.

Denker (1981) *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **53**, 10 123p.

Dinnyés *et al.* (2001) *Biol. Reprod.* **64**, 257-263.

Evans *et al.* (1981) *Nature* **292**, 154-156

Fan *et al.* (1999) *Pathol. Int.* **49**, 583-594.

Gottschewski *et al.* (1973) *Schaper, Hannover.*

15 Graur *et al.* (1996) *Nature* **379**, 333-335.

Hoeg *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11448-11453.

Kennelly et Foote (1965) *J. Reprod. Fert.* **9**, 177-188.

20 McGrath et Solter (1984) *Science* **226**, 1317-1319.

Meyer *et al.* (1997) *Methods Enzymol.* **283**, 113-128.

Mitalipov *et al.* (1999) *Biol. Reprod.* **60**, 821-827.

Moos *et al.* (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 739-748.

Ozil et Huneau (2001) *Development*, **128**, 917-928.

25 Polejaeva *et al.* (2000) *Nature* **407**, 86-90.

Soloy *et al.* (1997) *Biol. Reprod.* **57**, 27-35.

Solter (2000) *Nat. Rev., Genet.* **1**: 199-207.

Stinnackre *et al.* (1997) L.M. Houdebine ed., Harwood Academic Publishers, pp. 461-463.

30 Szöllösi (1966) *Anat. Rec.* **154**, 209-212.

Wakayama *et al.* (1998) *Nature* **394**, 369-374.

Wakayama *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14984-14989.

Wells *et al.* (1999) *Biol. Reprod.* **60**, 996-1005.

5 Whitfield *et al.* (1985) *Control of Animal Cell Proliferation* **1**, 331-365.

Wilmut *et al.* (1997) *Nature* **385**, 810-813.

Yin *et al.* (2000) *Theriogenology* **54**, 1460-1476.

REVENDICATIONS

1. Méthode de production d'embryons de mammifères
5 non humains comprenant les étapes suivantes :
 - (a) Evaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de même espèce et du même âge :
 - 10 (i) le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;
 - 15 (ii) le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par 20 activation parthénogénétique, l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon et ;
 - 25 (b) transférer un embryon au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T (+/- 25\%T)$;
 - 30 (c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production de mammifères non humains
5 comprenant les étapes suivantes :
 - (a) Evaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de même espèce et du même âge :
 - (i) le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;
 - 10 (ii) le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique,
 - 15 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon et;
 - (b) déterminer le temps $t = t_0 + T (\pm 25\% T)$ de croisement d'une femelle receveuse avec un mâle vasectomisé, avant le transfert facultatif d'un embryon au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* dans l'utérus de ladite femelle receveuse;
 - (c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que le dit premier embryon est cultivé et/ou manipulé *in vitro* au plus tard jusqu'au jour de l'implantation.

5

3. Procédé selon les revendications 1 à 2, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement choisi parmi, le stade 1 cellule, le stade 2 cellules, 10 le stade 4 cellules, le stade 8 cellules, le stade 16 cellules, le stade morula, le stade blastocyste.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est 15 réalisée au stade blastocyste.

5. Procédé selon la revendication 1 à 4, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination de l'asynchronie de développement T est 20 réalisée par comptage cellulaire.

6. Procédé selon les revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la dite asynchronie de développement T est d'au moins 15 heures.

25

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisée en ce que la dite asynchronie de développement T est de 24 heures.

30 8. Procédé selon les revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le dit embryon transféré à

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dit premier embryon est cultivé et/ou manipulé *in vitro* au plus tard jusqu'au jour de 5 l'implantation.

3. Procédé selon les revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement 10 choisi parmi, le stade 1 cellule, le stade 2 cellules, le stade 4 cellules, le stade 8 cellules, le stade 16 cellules, le stade morula, le stade blastocyste.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en 15 ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée au stade blastocyste.

5. Procédé selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'évaluation et/ou la 20 détermination de l'asynchronie de développement T est réalisée par comptage cellulaire.

6. Procédé selon les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la dite asynchronie de 25 développement T est d'au moins 15 heures.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la dite asynchronie de développement T est de 24 heures.

30

8. Procédé selon les revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le dit embryon transféré à

l'étape b) est cultivé dans les mêmes conditions que le dit premier embryon.

9. Procédé selon les revendications 1 à 8,
5 caractérisée en ce que le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule.

10. Procédé selon les revendications 1 à 8,
caractérisée en ce que le dit embryon transféré à
10 l'étape b), est au stade 2 cellules.

11. Procédé selon les revendications 1 à 8,
caractérisée en ce que le dit embryon, transféré à
étape (b), est au stade 4 cellules.

15

12. Procédé selon les revendications 1 à 11
caractérisée en ce que le dit embryon transféré se
développe en fœtus.

20 13. Procédé selon la revendication 12 caractérisée
en ce que le dit fœtus se développe en nouveau-né.

14. Procédé selon les revendications 1 à 13,
caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou
25 manipulé *in vitro* est un embryon transgénique.

15. Procédé selon les revendications 1 à 13,
caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou
manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par
30 transfert nucléaire.

l'étape b) est cultivé dans les mêmes conditions que le dit premier embryon.

9. Procédé selon les revendications 1 à 8,
5 caractérisé en ce que le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule.

10. Procédé selon les revendications 1 à 8,
caractérisé en ce que le dit embryon transféré à 10 l'étape b), est au stade 2 cellules.

11. Procédé selon les revendications 1 à 8,
caractérisé en ce que le dit embryon, transféré à étape (b), est au stade 4 cellules.

15 12. Procédé selon les revendications 1 à 11
caractérisé en ce que le développement du dit embryon transféré est arrêté au stade embryonnaire ou foetal.

20 13. Procédé selon les revendications 1 à 12,
caractérisé en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique.

25 14. Procédé selon les revendications 1 à 12,
caractérisé en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

30 15. Procédé selon les revendications 1 à 12,
caractérisé en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

16. Procédé selon les revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

5

17. Procédé selon les revendications 1 à 16, caractérisée en ce que le dit mammifère est sélectionné parmi les rongeurs, les lagomorphes, les ongulés, les équidés, les primates, excepté l'homme.

10

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit mammifère est un rongeur sélectionné parmi la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde.

15

19. Procédé selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit ongulés est sélectionné parmi les bovins, les ovins, les caprins, les porcins.

20

20. Procédé selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit lagomorphe est le lapin.

25

21. Embryon de mammifère excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

30

22. Embryon de mammifère transgénique excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

16. Procédé selon les revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le dit mammifère est sélectionné parmi les rongeurs, les lagomorphes, les ongulés, les 5 équidés, les primates, excepté l'homme.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le dit mammifère est un rongeur sélectionné parmi la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde.

10 18. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le dit ongulés est sélectionné parmi les bovins, les ovins, les caprins, les porcins.

15 19. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le dit lagomorphe est le lapin.

20. Embryon de mammifère excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte ou leur 20 descendance, ou cellules dérivées de ceux-ci, produit par un procédé selon l'une des revendications 1 à 19.

21. Embryon de mammifère transgénique excepté l'homme et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte ou 25 leur descendance, ou cellules dérivées de ceux-ci, produit par un procédé selon l'une des revendications 1 à 19.

23. Embryon de mammifère, excepté l'homme, reconstitué *in vitro* obtenu par transfert nucléaire, et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte, ou cellules 5 dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 1 à 20.

24. Descendance du dit mammifère adulte selon la 10 revendications 21 à 23.

25. Procédé *in vitro* de clonage de mammifère par transfert nucléaire comprenant ou incluant un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.

15

26. Procédé de production d'embryons de lapin comprenant les étapes suivantes :

a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de 20 développement (T) entre deux embryons de lapin du même âge :

- le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;
- le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter

22. Embryon de mammifère, excepté l'homme, reconstitué *in vitro* obtenu par transfert nucléaire, et/ou fœtus, nouveau-né, mammifère adulte ou leur descendance, ou cellules dérivées de ceux-ci, produit 5 par un procédé selon l'une des revendications 1 à 19.

23. Procédé *in vitro* de clonage de mammifère non humain par transfert nucléaire comprenant un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

10

24. Procédé de production de lapin comprenant les étapes suivantes :

a) évaluer et/ou déterminer l'asynchronie de développement (T) entre deux embryons de lapin du même 15 âge :

- le premier embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle de préférence vasectomisé avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le dit premier embryon étant au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro* ;
- le second embryon étant produit par croisement au temps t_0 d'un mâle fécond avec une femelle ayant de préférence reçu un traitement hormonal pour augmenter l'ovulation, le second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ;

30 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second

l'ovulation, le second embryon étant normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ;

5 l'évaluation et/ou la détermination ayant lieu au plus tard le jour de l'implantation utérine du dit second embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ; et

10 b) transférer un embryon de lapin cultivé et/ou manipulé *in vitro*, pas plus âgé que le stade blastocyste dans l'utérus d'une femelle receveuse ayant été croisée avec un mâle vasectomisé au temps $t = t_0 + T$ ($+/- 25\%T$) ;

15 c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement compris entre les 20 jours J1 et J7 *post coitum*.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisée en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée au jours J5 *post coitum*.

25 29. Procédé selon les revendications 26 à 28, caractérisée en ce que la dite asynchronie de développement T est de 23 heures $+/- 25\%$.

30 30. Procédé selon les revendications 26 à 29, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique.

embryon normalement fécondé ou obtenu par activation parthénogénétique ; et

b) déterminer le temps $t = t_0 + T$ ($\pm 25\%T$) de croisement d'une femelle receveuse avec un mâle vasectomisé, avant le transfert facultatif d'un embryon de lapin au moins cultivé et/ou manipulé *in vitro*, pas plus âgé que le stade blastocyste dans l'utérus de ladite femelle receveuse;

c) facultativement, laisser le dit embryon transféré à l'étape b) s'implanter et se développer dans l'utérus de la dite femelle receveuse.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée à un stade de développement compris entre les jours J1 et J7 *post coitum*.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'évaluation et/ou la détermination est réalisée au jour J5 *post coitum*.

27. Procédé selon les revendications 24 à 26, caractérisé en ce que la dite asynchronie de développement T est de 23 heures $\pm 25\%$.

25

28. Procédé selon les revendications 24 à 27, caractérisé en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique.

30

31. Procédé selon les revendications 26 à 29, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par 5 transfert nucléaire.

32. Procédé selon les revendications 26 à 29, caractérisée en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique 10 reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

33. Procédé selon les revendications 26 à 32, caractérisée en ce que le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule.

15

34. Embryon de lapin et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte, ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 26 à 33.

20

35. Embryon de lapin transgénique et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 26 à 33.

25

36. Embryon de lapin reconstitué *in vitro* obtenu par transfert nucléaire et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte, ou cellules dérivés de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une 30 des revendications 26 à 33.

29. Procédé selon les revendications 24 à 27, caractérisé en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

5

30. Procédé selon les revendications 24 à 27, caractérisé en ce que le dit embryon cultivé et/ou manipulé *in vitro* est un embryon transgénique reconstitué obtenu par transfert nucléaire.

10

31. Procédé selon les revendications 24 à 30, caractérisé en ce que le dit embryon transféré à l'étape b) est au stade 1 cellule.

15

32. Embryon de lapin et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte et leur descendance, ou cellules dérivées de ceux-ci, produit par un procédé selon l'une des revendications 24 à 31.

20

33. Embryon de lapin transgénique et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte et leur descendance ou cellules dérivées de ceux-ci, produit par un procédé comprenant ou incluant le procédé selon l'une des revendications 24 à 31.

25

34. Embryon de lapin reconstitué *in vitro* obtenu par transfert nucléaire et/ou fœtus, nouveau-né, lapin adulte et leur descendance, ou cellules dérivées de ceux-ci, produit par un procédé selon l'une des revendications 24 à 31.

37. Descendance du dit lapin adulte selon la revendications 34 à 36.

38. Procédé *in vitro* de clonage de lapin par 5 transfert nucléaire comprenant ou incluant un procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 33.

39. Procédé *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprenant les étapes de :

- 10 a) insertion d'une cellule donneuse de lapin ou d'un noyau de cellule donneuse de lapin dans un ovocyte énucléé de lapine dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;
- 15 b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a) ;
- c) transfert dudit embryon reconstitué dans une lapine porteuse, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus, et éventuellement en nouveau né ; et

20 caractérisé en ce que le procédé comprend ou inclut un procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 33.

40. Procédé selon la revendication 39 caractérisée 25 en ce que le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par fusion de la cellule donneuse et du cytoplasme receveur.

41. Procédé selon la revendication 39 caractérisée 30 en ce que le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par micro-injection du noyau donneur dans le cytoplasme receveur.

35. Procédé *in vitro* de clonage de lapin par transfert nucléaire comprenant un procédé selon l'une quelconque des revendications 24 à 31.

5 36. Procédé selon la revendication 35 comprenant les étapes de :

a) insertion d'une cellule donneuse de lapin ou d'un noyau de cellule donneuse de lapin dans un ovocyte énucléé de lapine dans des conditions permettant 10 d'obtenir un embryon reconstitué ;
b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a).

37. Procédé selon la revendication 36 caractérisé 15 en ce que le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par fusion de la cellule donneuse et du cytoplasme receveur.

38. Procédé selon la revendication 36 caractérisé 20 en ce que le transfert de noyau dans le cytoplasme receveur est effectué par micro-injection du noyau donneur dans le cytoplasme receveur.

39. Procédé selon la revendication 36 caractérisé 25 en ce que la dite phase d'activation au cours de la culture *in vitro* est réalisée par adjonction simultanée, successive ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un 30 inhibiteur de la synthèse protéique.

42. Procédé selon la revendication 39 caractérisée en ce que la dite phase d'activation au cours de la culture *in vitro* est réalisée par adjonction 5 simultanée, successive ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique.

10 43. Procédé *in vitro* de clonage de mammifère, non humain, comprenant les étapes de :

- a) insertion d'une cellule donneuse ou d'un noyau de cellule donneuse dans un oocyte énucléé de mammifère de la même espèce ou d'une espèce 15 différente de celle de la cellule donneuse, dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;
- b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a) ;
- 20 c) transfert dudit embryon reconstitué dans une femelle porteuse de mammifère, de sorte que le l'embryon reconstitué se développe en fœtus, caractérisé en ce que la dite activation est réalisée par adjonction simultanée, successive ou décalée dans 25 le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique.

30 44. Procédé selon la revendication 43 caractérisé en ce que le dit mammifère est sélectionné parmi le lapin, les rongeurs, notamment le rat, la souris, et

40. Procédé *in vitro* de clonage de mammifère, non humain, comprenant les étapes de :

5 a) insertion d'une cellule donneuse ou d'un noyau de cellule donneuse dans un oocyte énucléé de mammifère de la même espèce ou d'une espèce différente de celle de la cellule donneuse, dans des conditions permettant d'obtenir un embryon reconstitué ;

10 b) activation de l'embryon reconstitué obtenu à l'étape a) avant le transfert facultatif dudit embryon reconstitué dans une femelle porteuse de mammifère, de sorte que l'embryon reconstitué se développe en fœtus,

15 caractérisé en ce que la dite activation est réalisée par adjonction simultanée, successive ou décalée dans le temps, au milieu de culture du dit embryon reconstitué, d'au moins un inhibiteur de protéine kinase et d'au moins un inhibiteur de la synthèse protéique.

20

41. Procédé selon la revendication 40 caractérisé en ce que le dit mammifère est sélectionné parmi le lapin, les rongeurs, notamment le rat, la souris, et parmi les bovins, les ovins, les caprins, les porcins, 25 les équidés, les primates, à l'exception de l'homme.

42. Procédé selon les revendications 39 à 41 caractérisé en ce que le dit inhibiteur de protéine kinase est le 6-DMAP et le dit inhibiteur de la 30 synthèse protéique est la cycloheximide (CHX).

parmi les bovins, les ovins, les caprins, le porcins, les équidés, les primates, à l'exception de l'homme.

45. Procédé selon la revendication 42 à 44
5 caractérisé en ce que le dit inhibiteur de protéine kinase est le 6-DMAP et le dit inhibiteur de la synthèse protéique est la cycloheximide (CHX).

46. Procédé de production d'une protéine
10 recombinante par un animal transgénique comprenant l'étape de production d'un embryon de mammifère non humain selon les revendications 1 à 20.

47. Procédé de production d'une protéine
15 recombinante par un lapin transgénique comprenant l'étape de production d'un embryon de lapin selon les revendications 26 à 33.

48. Utilisation d'un animal transgénique
20 susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 1 à 20 ou d'un lapin transgénique susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 26 à 33 comme modèle d'étude de pathologies humaines.

25

49. Utilisation d'un animal transgénique susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 1 à 20 ou d'un lapin transgénique susceptibles d'être obtenu par le procédé selon les revendications 26 à 33 pour la production de protéines recombinantes.

43. Procédé de production d'une protéine recombinante par un mammifère transgénique excepté l'homme comprenant l'étape de production d'un mammifère non humain selon les revendications 1 à 19.

5

44. Procédé de production d'une protéine recombinante par un lapin transgénique comprenant l'étape de production d'un lapin selon les revendications 24 à 31.

10

45. Utilisation d'un mammifère transgénique excepté l'homme, obtenu par le procédé selon les revendications 1 à 19 ou d'un lapin transgénique obtenu par le procédé selon les revendications 24 à 31 comme modèle d'étude 15 de pathologies humaines.

46. Utilisation d'un mammifère transgénique excepté l'homme obtenu par le procédé selon les revendications 1 à 19 ou d'un lapin transgénique obtenu par le procédé 20 selon les revendications 24 à 31 pour la production de protéines recombinantes.

47. Utilisation selon la revendication 46 caractérisée en ce que la dite protéine recombinante 25 est produite dans le lait de l'animal transgénique.

50. Utilisation selon la revendication 49 caractérisée en ce que la dite protéine recombinante est produite dans le lait de l'animal transgénique.

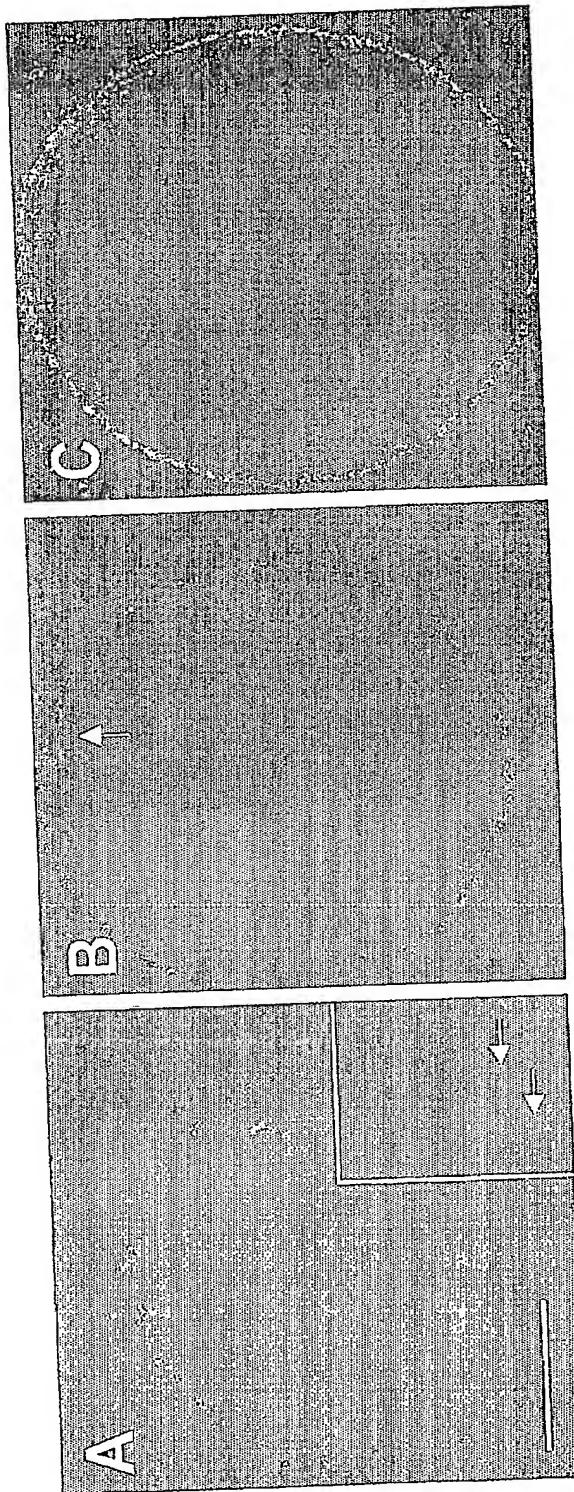


Figure 1

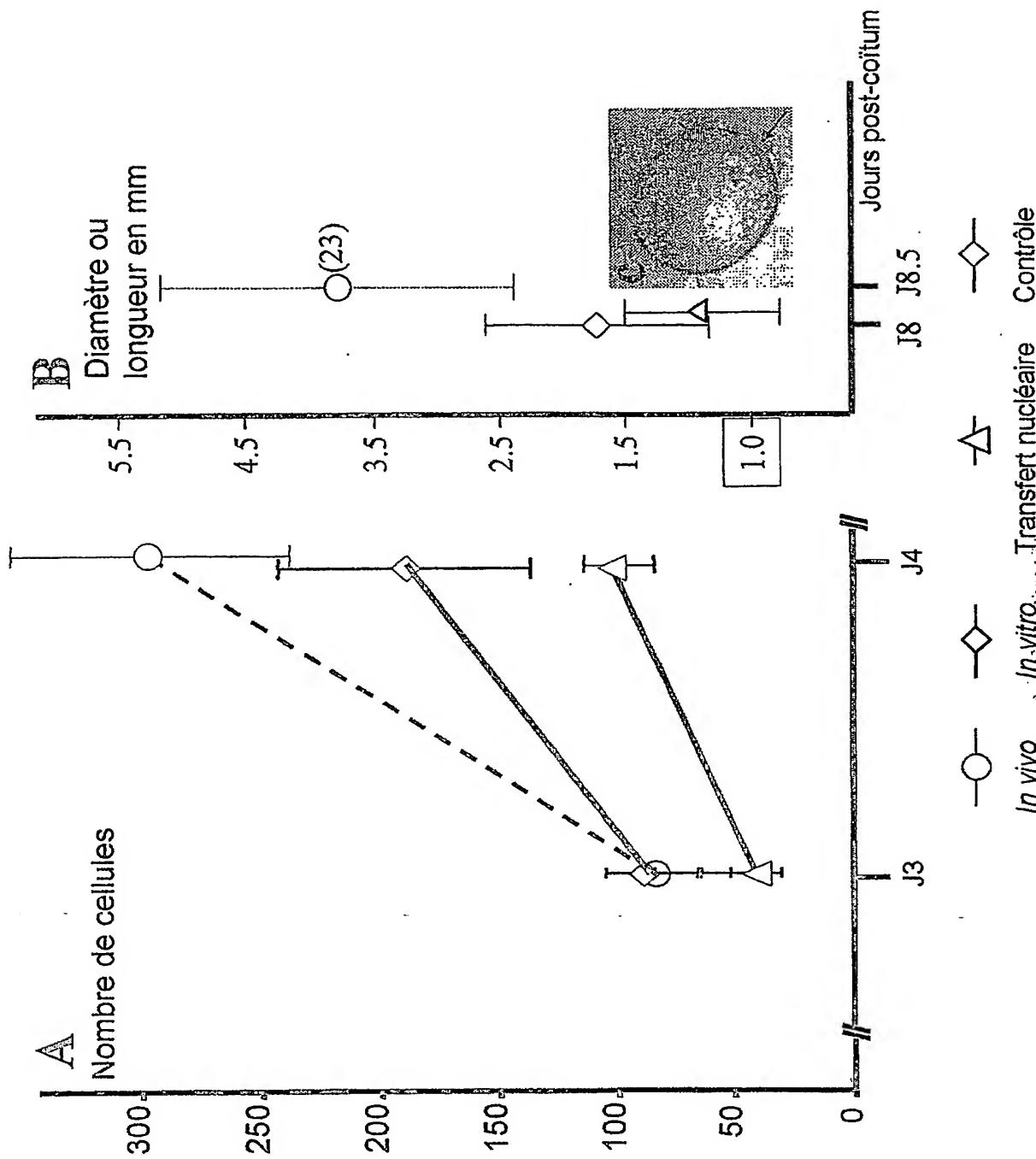


Figure 2

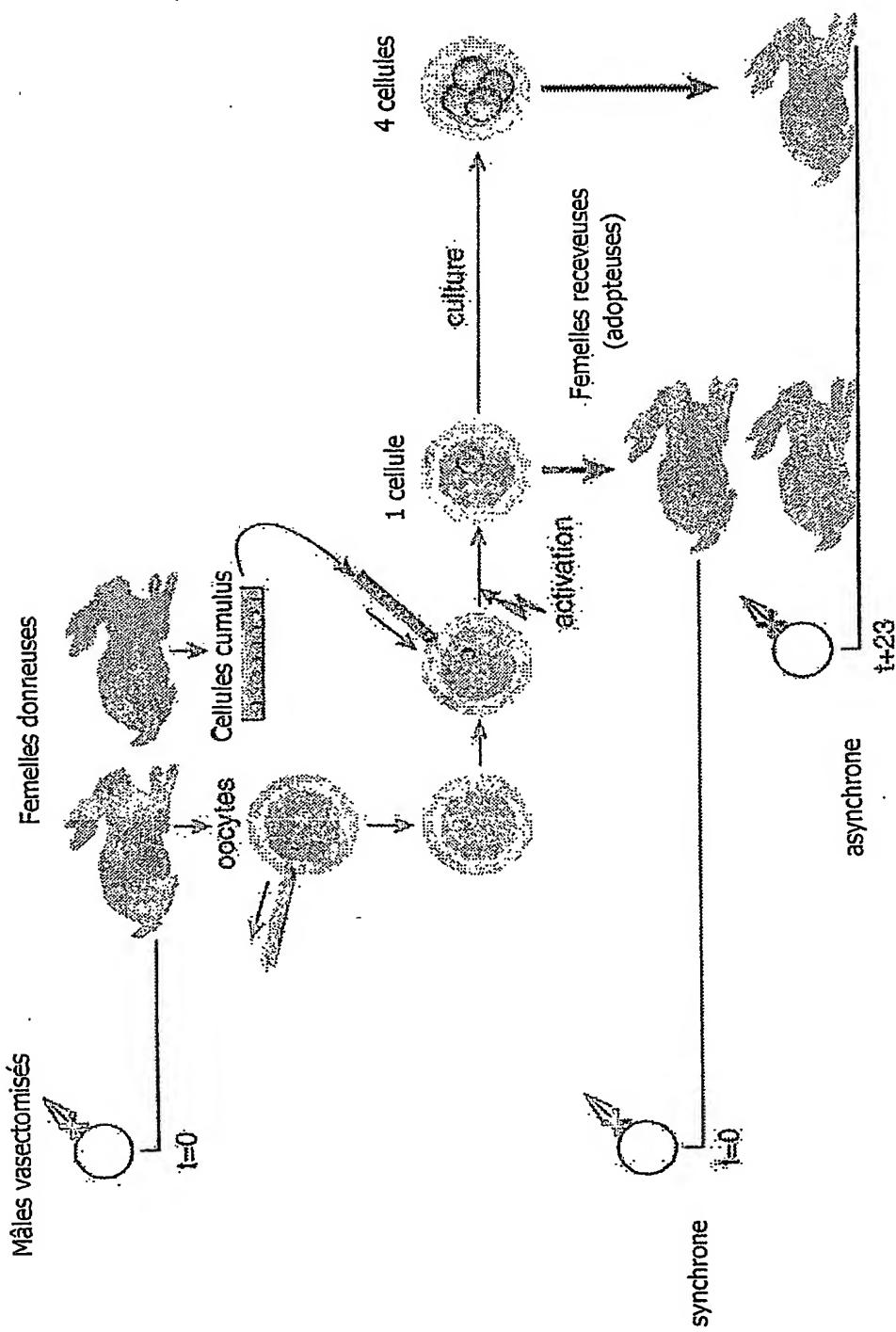


Figure 3

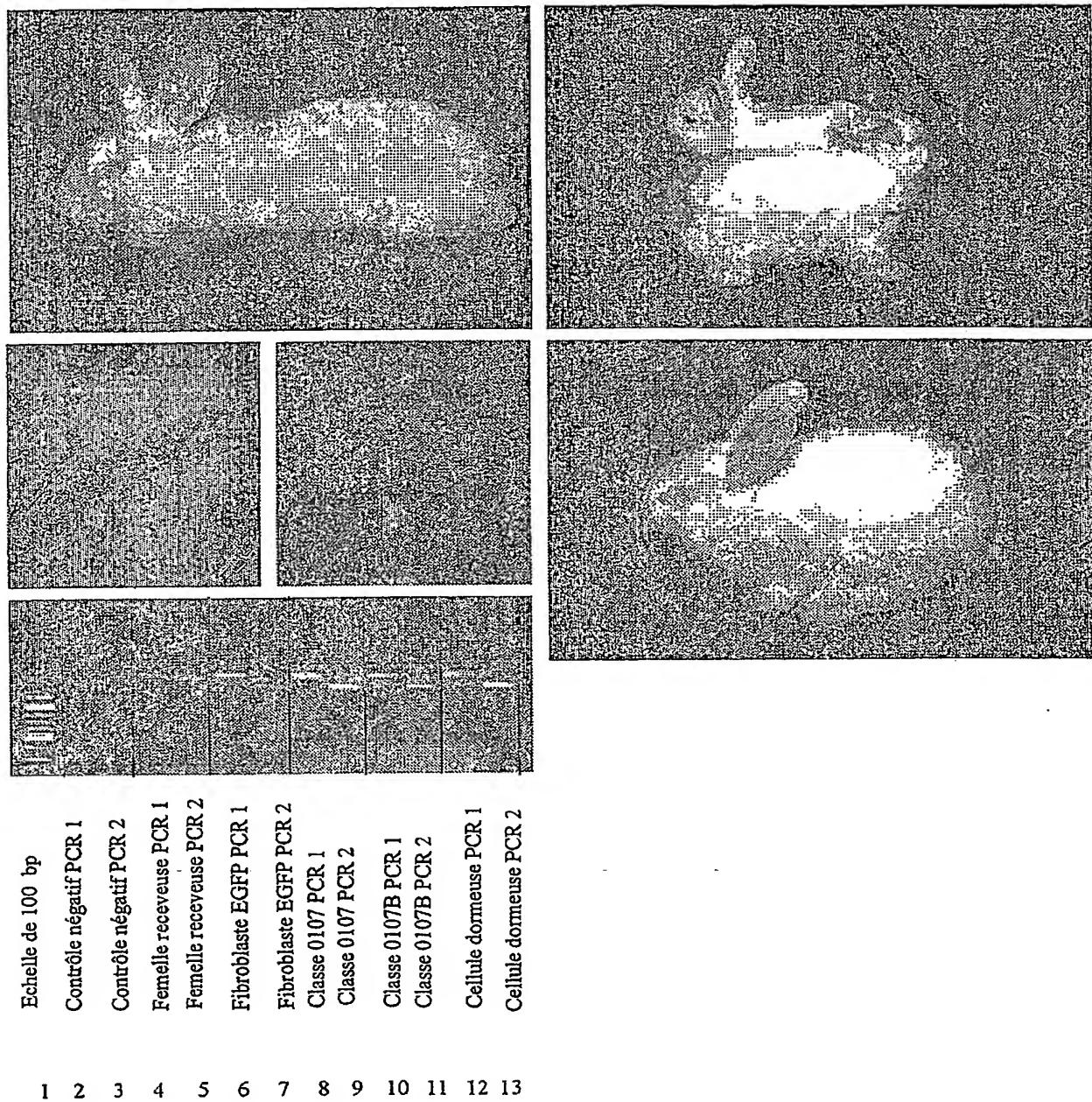


Figure 4

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut National de la Recherche Agronomique - INRA

<120> Procédé de clonage nucléaire chez le lapin et utilisations

<130> D19857

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce sens du marqueur GFP (green fluorescence protein).

<400> 1

gagtttggat cttggatcat

20

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce antisens du marqueur GFP (green fluorescence protein).

<400> 2

ggcacgggca gcttgccggt gg

22

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce sens de l'exon 10 du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator).

<400> 3

tttcctgga tcatgcctgg cac

23

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce antisens de l'exon 10 du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator).

<400> 4

ctacctgttag cagcttaccc a

21

DÉPARTEMENT DES BREVETS

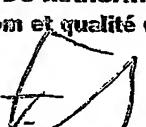
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ..1/1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260399

Vos références pour ce dossier (facultatif) 239490 D19857 PM		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0200268
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCEDE DE CLONAGE NUCLEAIRE CHEZ LE LAPIN ET UTILISATIONS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE : 145, rue de l'Université 75007 PARIS - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» Si il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		CHESNE Patrick
Prénoms		
Adresse	Rue	12, Square Delacroix 78960 VOISINS LE BRETONNEUX
	Code postal et ville	FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		ADENOT Pierre
Prénoms		
Adresse	Rue	37, rue Linois 75015 PARIS
	Code postal et ville	FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		RENAUD Jean Paul
Prénoms		
Adresse	Rue	72, rue Julien 92170 VANVES
	Code postal et ville	FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 92-1001		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.